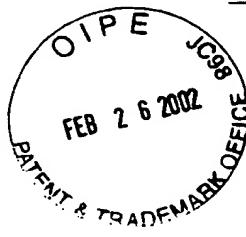


09/826,907

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 10 346.8
Anmeldetag: 03. März 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotid-
sequenzen
Priorität: 10.08.2000 DE 100 39 047.1
IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

• Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren,
5 insbesondere L-Lysin und L-Valin, durch Abschwächung des lysR2-Gens. Das lysR2-Gen kodiert für das LysR2-Protein, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist.

Stand der Technik

10 L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere
15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR2-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%

20 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15

25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR2 aufweist.

-Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern.

Weitere Gegenstände sind

- 15 a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 231,
- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 232 und 1161,
- 20 c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1162 und 1364.

Weitere Gegenstände sind:

- 30 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

-ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

5 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz

und coryneforme Bakterien, in denen das lysR2-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist

10 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält
15 5 mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um
20 Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LysR2-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise
50 5 Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR2-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-
30 Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das LysR2-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt

-mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 5 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld 10 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

15 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz 20 besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder einem daraus hergestellten Fragment.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene 25 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des LysR2-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 30 81% bis 85% und besonders zu wenigstens 86% bis 90% und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, insbesondere L-Lysin und L-Valin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das lysR2-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen bzw. Allel oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
10 Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-
Lysin produzierenden Stämme

• Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
15 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und
20 Corynebacterium glutamicum DSM 12866

oder wie beispielsweise die L-Valin produzierenden Stämme
Corynebacterium glutamicum DSM 12455
Corynebacterium glutamicum FERM-P 9325
• Brevibacterium lactofermentum FERM-P 9324
25 Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das LysR2-Protein
kodierende lysR2-Gen von C. glutamicum, welches ein
Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist, zu isolieren.

Zur Isolierung des lysR2-Gens oder auch anderer Gene von C.
30 glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als

-Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual 5 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine 10 Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. 15 (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHC79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* 20 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm 25 DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren 30 klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of

-Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von 5 Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das lysR2-Gen kodierende 10 DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die 15 sich ergebende Aminosäuresequenz des lysR2-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch 20 die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative 25 Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist 30 bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 35 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences

-3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind 5 ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben 10 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH 15 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: 20 Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach 25 Abschwächung des lysR2-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des lysR2-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder 30 ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)

der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und 5 Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 10 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers 15 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind 20 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threoninhydratase aus

25 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und

30 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von 35 der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die

.Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu

5 Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung

10 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und

15 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von C. glutamicum zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 20 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene replacement).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder 25 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., 30 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder

- pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunigan und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1lysR2int gezeigt, mit Hilfe dessen das lysR2-Gen unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde

-beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das lysR2-Gen kann auf diese Weise eine Deletion,
5 Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des lysR2-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der
10 Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder
15 mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein)
20 mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
25 ◦ das für die Dihydridopicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
◦ das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
◦ das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

o das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc
(Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927
(1998))

5 o das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE
(DE-A-195 48 222)

o das für eine feed back resistente Aspartatkinase
kodierende Gen lysC (EP-B-0387527; EP-A-0699759)

o das für das zwal-Protein kodierende Gen zwal
(DE: 199 59 328.0, DSM 13115)

10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Valin
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene bzw. Allele,
ausgewählt aus der Gruppe

15 o gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase
kodierenden Gene ilvBN (Keilhauer et al., (1993) Journal
of Bacteriology 175: 5595-5603), oder

o gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende ilvD-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and
Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder

20 o gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase
kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of
Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren,
25 insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der
Abschwächung des lysR2-Gens gleichzeitig eines oder mehrere
der Gene ausgewählt aus der Gruppe

• das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),

• das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),

5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

• das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113),

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten.

10 Schließlich kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR2-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

15 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A-0131171),

• das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen thrB (Peoples, O.W., et al., Molecular Microbiology 2 (1988): 63 - 72), und

20 • das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen panD (EP-A-1006192)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten.

Die Abschwächung der Homoserin-Dehydrogenase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Valin gegen L-Alanin, L-Glycin

25 oder L-Leucin an Position 59 des Enzymproteins, durch den Austausch von L-Valin gegen L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin an Position 104 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Asparagin gegen L-Threonin oder L-Serin an Position 118 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Homoserin-Kinase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Alanin gegen L-Valin, L-Glycin oder L-Leucin an Position 133 des Enzymproteins und/oder durch den 5 Austausch von L-Prolin gegen L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Serin an Position 138 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Aspartat-Decarboxylase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch die Austausche L-Alanin gegen L-Glycin, L-Valin oder 10 L-Isoleucin an Position 36 des Enzymproteins erreicht werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR2-Gens unerwünschte 15 Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind 20 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere 25 L-Lysin und L-Valin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und 30 periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,

5 Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum

10 Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

25 Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen

30 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie

35 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise

eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende 5 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20 °C bis 45 °C und vorzugsweise bei 10 25 °C bis 40 °C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem 15 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei 20 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des folgender Mikroorganismus wurde am 28. Juli 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß 25 Budapest Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm TOP10F/pCR2.1lysR2int als DSM 13617.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L- 30 Valin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

-Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring 5 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. 10 entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei 15 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche 20 Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma 25 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase 30 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 1.0 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

-Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens lysR2

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, 5 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular 10 Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, 15 Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenzervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, 20 Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei 25 das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et 30 al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, 5 Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem 10 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

15 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembled. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem 20 Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

25 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 933 Basenpaaren, welches als lysR2-Gen bezeichnet wurde. Das lysR2-Gen kodiert für ein 30 Polypeptid von 310 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des lysR2-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von
5 Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994))
chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für
C. glutamicum bekannten Sequenz des lysR2-Gens wurden die
folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion
ausgewählt (siehe SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 5):

10 lysR2intA:
5`CCA TCG TCG CAG AAT TCA AC 3`
lysR2intB:
5`GCT TCT TCG GCT AAT GCA TC 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech
15 (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A
guide to methods and applications, 1990, Academic Press)
mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion
durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion
20 wurde ein 439 bp großes internes Fragment des lysR2-Gens
isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA
Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA,
USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO
25 (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10F mit dem
Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical
approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA,
1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden
30 Zellen erfolgte durch Ausplattieren des
Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989),

der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und 5 anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1lysR2int genannt.

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des lysR2-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715 bzw. in dem Valinproduzenten FERM

10 BP-1763

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysR2int wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 bzw. Brevibacterium

15 lactofermentum FERM BP-1763 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten (EP-B-435 132). Bei dem Stamm FERM BP-1763 handelt es sich um einen Isoleucin und Methionin bedürftigen Valin-Produzenten (US-A-5,188,948). Der Vektor

20 pCR2.1lysR2int kann in DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP- 25 1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1lysR2int erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar

(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

30 Für den Nachweis der Integration wurde das lysR2int- Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

-Chromosomal DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten.

5 Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybrisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1lysR2int hatte innerhalb des chromosomalen lysR2-Gens ins Chromosom von DSM 5715 10 bzw. FERM BP-1763 inseriert. Die Stämme wurden als DSM5715::pCR2.1lysR2int bzw. FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von L-Lysin und L-Valin

15 Die in Beispiel 4 erhaltenen C. glutamicum bzw. B. lactofermentum Stämme DSM5715::pCR2.1lysR2int und FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int wurden in einem zur Produktion von L-Lysin und L-Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-Lysin- bzw. L-Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

20 Dazu wurden die Stämme zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die 25 Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur
wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler
5 inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur
angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur
0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM
verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g/l

KH_2PO_4 0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin * HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

CaCO_3 25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken

5 autoklavierte CaCO_3 zugesetzt. Für die Kultivierung von DSM 5715 wurde dem Medium zusätzlich 0,1 g/l Leucin zugesetzt. Für die Kultivierung von FERM BP-1763 wurden zusätzlich 0,1 g/l Isoleucin und 0,1 g/l Methionin zugesetzt.

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysin- bzw. L-Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma 5 Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In den Tabellen 1 bzw. 2 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

10

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,5	13,01
DSM5715::pCR2.1lysR2int	7,2	14,68

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin g/l
FERM BP-1763	12,1	7,49
FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int	13,4	10,90

15

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000181 BT

<140>

10 <141>

<160> 5

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1364

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (232)..(1161)

<223> lysR2-Gen

25

<400> 1

cctgcgtgca ataaagacca ttgaaaggcag caagaccggc ggccagcatc gcaaacacag 60

30

cgcgcttgta attgcgtgtt cctcgctcga tgccttcgtg gccttcgtgg cttcgtgtg 120

cctcgacctt gctatctatt gcttggctca tggagttcat catgcgccaa cagcaaataat 180

tagtaaaatg ttagaaatag ctgttttga ttcactttgt gcatgttaggc t gtg acc 237

Met Thr

35

1

atg ggc aac gac ggc gga gac ctg cga atc gac gac cta cgc agc ttc 285
Met Gly Asn Asp Gly Gly Asp Leu Arg Ile Asp Asp Leu Arg Ser Phe

5

10

15

(40) att tca gtc gct caa tca ggc cac ctc acc gaa act gcc gaa aga tta 333
Ile Ser Val Ala Gln Ser Gly His Leu Thr Glu Thr Ala Glu Arg Leu

20

25

30

45 ggc atc ccg cag ccc aca ctt tcc aga cga atc agc cga gtg gaa aaa 381
Gly Ile Pro Gln Pro Thr Leu Ser Arg Arg Ile Ser Arg Val Glu Lys

35

40

45

50

50 cac gca ggc acc cca ctt ttc gac cgc gcc ggc cgc aaa ctc gtc ctc 429
His Ala Gly Thr Pro Leu Phe Asp Arg Ala Gly Arg Lys Leu Val Leu

55

60

65

55 aac caa cga ggc cac gcc ttc ctc aac cac gcc agc gcc atc gtc gca 477
Asn Gln Arg Gly His Ala Phe Leu Asn His Ala Ser Ala Ile Val Ala

70

75

80

gaa ttc aac tcc gcc gca act gaa atc aaa cgc ctc atg gac cca gaa 525
Glu Phe Asn Ser Ala Ala Thr Glu Ile Lys Arg Leu Met Asp Pro Glu

85

90

95

100 105 110 573
 Lys Gly Thr Ile Arg Leu Asp Phe Met His Ser Leu Gly Thr Trp Met
 5 5
 115 120 125 130 621
 Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Phe Arg Ala Glu His Pro Asn Val Glu
 10 10
 135 140 145 669
 Phe Gln Leu His Gln Ala Ala Ala Met Leu Leu Val Asp Arg Val Leu
 15 15
 150 155 160 717
 Ala Asp Glu Thr Asp Leu Ala Leu Val Gly Pro Lys Pro Ala Glu Val
 20 20
 165 170 175 765
 Gly Thr Ser Leu Gly Trp Ala Pro Leu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Leu
 25 25
 180 185 190 813
 Ala Val Pro Ala Asp His Arg Leu Ala Ser Phe Ser Gly Gln Gly Glu
 30 30
 195 200 205 210 861
 Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ala Glu Glu Pro Phe Val Ala Met Arg Ala
 35 35
 215 220 225 909
 ggt ttc ggc acc cga ctc atc gat gca tta gcc gaa gaa gcc ggt
 Gly Phe Gly Thr Arg Leu Leu Met Asp Ala Leu Ala Glu Glu Ala Gly
 40 40
 230 235 240 957
 ttt gtt ccc aat gtg gtt ttc gaa tcc atg gaa ctc acc acc gtc gca
 Phe Val Pro Asn Val Val Phe Glu Ser Met Glu Leu Thr Thr Val Ala
 45 45
 245 250 255 1005
 ggg ctt gtc agc gca ggt ctc ggc gtt ggt gtg gtt ccg atg gat gat
 Gly Leu Val Ser Ala Gly Leu Gly Val Val Pro Met Asp Asp
 50 50
 260 265 270 1053
 ccg tac ctt ccc aca gtg gga atc gtg caa cgc cca ctt agt cca ccc
 Pro Tyr Leu Pro Thr Val Gly Ile Val Gln Arg Pro Leu Ser Pro Pro
 55 55
 275 280 285 290 1101
 gct tat agg gaa cta ggt ttg gtg tgg cga ctc aac gcg ggg ccg gca
 Ala Tyr Arg Glu Leu Gly Leu Val Trp Arg Leu Asn Ala Gly Pro Ala
 310 310 305 1149
 cct gcg gtg gat aac ttc cgg aag ttc gtg gcg gga tcg agg tat gca
 Pro Ala Val Asp Asn Phe Arg Lys Phe Val Ala Gly Ser Arg Tyr Ala
 tta gaa gag ggc tgtagctgtaa gtgtcgtggg tgccgttta aggggttgag
 Leu Glu Glu Gly 1201
 310
 tttccccat gactaggagt tggccagat tgtgcgttag gggcccttag gggcgattct 1261

ggggctggtg ttttgtggc catgggggtt ggtgttaatc ctggaggctt gctgcaagat 1321
 tgctgttaaa cttctcgtaa cgatcgctt ggaaagcctg gaa 1364

5 <210> 2
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

10 <400> 2
 Met Thr Met Gly Asn Asp Gly Gly Asp Leu Arg Ile Asp Asp Leu Arg
 1 5 10 15

15 Ser Phe Ile Ser Val Ala Gln Ser Gly His Leu Thr Glu Thr Ala Glu
 20 25 30

Arg Leu Gly Ile Pro Gln Pro Thr Leu Ser Arg Arg Ile Ser Arg Val
 35 40 45

20 Glu Lys His Ala Gly Thr Pro Leu Phe Asp Arg Ala Gly Arg Lys Leu
 50 55 60

25 Val Leu Asn Gln Arg Gly His Ala Phe Leu Asn His Ala Ser Ala Ile
 65 70 75 80

Val Ala Glu Phe Asn Ser Ala Ala Thr Glu Ile Lys Arg Leu Met Asp
 85 90 95

30 Pro Glu Lys Gly Thr Ile Arg Leu Asp Phe Met His Ser Leu Gly Thr
 100 105 110

Trp Met Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Phe Arg Ala Glu His Pro Asn
 115 120 125

35 Val Glu Phe Gln Leu His Gln Ala Ala Ala Met Leu Leu Val Asp Arg
 130 135 140

40 Val Leu Ala Asp Glu Thr Asp Leu Ala Leu Val Gly Pro Lys Pro Ala
 145 150 155 160

Glu Val Gly Thr Ser Leu Gly Trp Ala Pro Leu Leu Arg Gln Arg Leu
 165 170 175

45 Ala Leu Ala Val Pro Ala Asp His Arg Leu Ala Ser Phe Ser Gly Gln
 180 185 190

Gly Glu Leu Pro Leu Ile Thr Ala Ala Glu Glu Pro Phe Val Ala Met
 195 200 205

50 Arg Ala Gly Phe Gly Thr Arg Leu Leu Met Asp Ala Leu Ala Glu Glu
 210 215 220

Ala Gly Phe Val Pro Asn Val Val Phe Glu Ser Met Glu Leu Thr Thr
 55 225 230 235 240

Val Ala Gly Leu Val Ser Ala Gly Leu Gly Val Gly Val Val Pro Met
 245 250 255

Asp Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Val Gly Ile Val Gln Arg Pro Leu Ser
 260 265 270

5 Pro Pro Ala Tyr Arg Glu Leu Gly Leu Val Trp Arg Leu Asn Ala Gly
 275 280 285

Pro Ala Pro Ala Val Asp Asn Phe Arg Lys Phe Val Ala Gly Ser Arg
 290 295 300

10 Tyr Ala Leu Glu Glu Gly
 305 310

15 <210> 3
 <211> 439
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <220>
 <223> lysR2int

<400> 3
 ccatcgtcgc agaattcaac tccgcccaca ctgaaatcaa acgcctcatg gaccaggaaa 60
 25 aaggcacaat ccgactggac ttcatgcatt ccttggcac ttggatggtc cccgaactta 120
 tccgaacatt ccgcggccaa caccggaaactccaaacg tagaattcca actccaccaa gcggcagcaa 180
 tgctccttgtt agatcggtt ttggctgatg aaactgaccc cgcatcttttggggtagtt ggccccaaac 240
 ctgcccgggt tggtagctt ttaggggtggg cggcactgct tcgtcaacga cttggccctag 300
 30 ctgttcccgc agatcaccgg cttgcctctt tttctggcca aggagaattt ccgttgattt 360
 ctgcggcggaa agaaccttgc gtggcgatgc gagcagggtt cggcacccga ctcctcatgg 420
 atgcatttgc cgaagaagc 439

35 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

40 <220>
 <223> Primer lysR2intA

<400> 4
 ccatcgtcgc agaattcaac 20

45 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

50 <220>
 <223> Primer lysR2intB

<400> 5
 55 gcttcgg ctaatgcac 20

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1lysR2int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR: Kanamycin Resistenz-Gen

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI

lysR2int: internes Fragment des lysR2-Gens

ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmids ColE1

. Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR2-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR2 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

- (iv) (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in
 - (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptids nicht verändern.

10 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID Nr. 1 dargestellt.

6. Vektor pCR2.1lysR2int, der

15 6.1 ein 439 bp großes internes Fragment des citA-Gens trägt,

6.2 dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben wird, und

20 6.3 der in dem E.coli-Stamm TOP10F/pCR2.1lysR2int unter der Nr. DSM 13617 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt ist.

25 7. Coryneforme Bakterien, in denen das lysR2-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird, insbesondere durch Deletion.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, durch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,
30 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das lysR2-Gen abschwächt,

b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

5 9. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-
Aminosäure verstärkt.

10 10. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
15

11. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e),
das (die) für das lysR2-Gen kodiert (kodieren)
20 verringert, insbesondere ausschaltet.

12. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die regulatorischen Eigenschaften des
Polypeptids herabsetzt, für das das Polynukleotid
lysR2 kodiert.
25

13. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen
30 man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe

13.1 das für die Dihydripicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 13.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 13.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 13.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,

5 13.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,

 13.6 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC

 13.7 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
verstärkt, bevorzugt überexprimiert.

10 14. Verfahren gemäß Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe:

15 14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,

 14.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,

 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,

 14.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2,

20 14.5 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,

 14.6 das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen thrB,
und

25 14.7 das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen panD
abschwächt, insbesondere ausschaltet.

15. Verfahren gemäß Anspruch 8,
durch gekennzeichnet,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Valin, Bakterien fermentiert, in denen
5 man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe

15.1 die für die Acetohydroxysäuresynthase
kodierenden Gene ilvBN,
10 15.2 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende
ilvD-Gen,

15.3 as für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende
mqa-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
15 Ansprüche,
durch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum bzw. Brevibacterium lactofermentum
einsetzt.

20 17. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder
Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator
LysR2 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der
Sequenz des lysR2-Gens aufweisen,
25 durch gekennzeichnet,
dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den
Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

30 18. Verfahren gemäß Anspruch 15,
durch gekennzeichnet, daß man
arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.

Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine
Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
 mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
 kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
 eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
 SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
 Polynukleotiden von a) oder b), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
 aufeinanderfolgende Nukleotide der
 Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
 Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
 denen zumindest das lysR2-Gen abgeschwächt vorliegt, und
 die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als
 Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1lysR2int

